

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Prevalencia de leptospirosis bovina en dos localidades
de Puno en época seca y determinación de factores de
riesgo**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTORA

María Fiorella Arias Chauca

Lima-Perú

2008

Dedico este trabajo primero a Dios por haberme dado la fuerza e inteligencia para seguir el buen camino y ayudarme en los momentos difíciles.

A mi padre por siempre guiar mis pasos y estar pendiente de mí.

A mi madre por su apoyo, sus palabras, su amor.

A mi hermana Lily, por que ella es mi ejemplo a seguir y sus palabras me dieron fuerza para seguir adelante.

A mi hermano Christian por que siempre me dio su apoyo, su confianza y amor fraternal.

A mi hermanito querido, Rolando que con sus ocurrencias hizo que mi vida tuviera muchos momentos felices.

Al amor de mi vida, Renzo por su gran apoyo, por ser mi mejor amigo y enseñarme las cosas importantes de la vida.

A toda mi familia, a mis amigos y a mis queridos hermanos menores.

A mis queridos maestros de carrera, en especial al Dr. Francisco Suarez que me dio su apoyo siempre

CONTENIDO

	Pag.
CONTENIDO	ii
RESUMEN	iv
SUMMARY	v
LISTA DE CUADROS	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Etiología	3
2.2. Epidemiología	4
2.3. Modo de Transmisión y fuentes de infección	9
2.3.1. Factores asociados a la infección	11
A. Factores dependientes del agente etiológico	11
B. Factores dependientes del hospedador	11
C. Factores dependientes del medio ambiente	12
2.4. Patogenia e Inmunidad	12
2.5. Signos Clínicos	16
2.6. Diagnóstico	17
2.6.1. Identificación del Agente	18
A. Cultivo	19
B. Inmunofluorescencia	19
C. Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)	20
2.6.2. Pruebas serológicas	20
A. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)	20
B. Inmunoabsorbancia Ligada a Enzima (ELISA)	22
C. Hemaglutinación Indirecta	22
D. Test de Aglutinación en Latex (LAT)	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Lugar de estudio	24
3.1.1. Ubicación	24

3.1.2. Animales	24
3.1.3. Clima	24
3.1.4. Características de los hatos	25
3.2. Materiales	25
3.2.1. Materiales de apoyo	25
3.2.2. Materiales para MAT	25
3.3. Toma de muestras	26
3.4. Procesamiento de las muestras	26
3.4.1. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)	26
3.4.2. Detección de Anticuerpos contra <i>Leptospira</i> sp.	27
3.4.3. Titulación de Anticuerpos	28
3.5. Análisis de datos	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	35
VII. RECOMENDACIONES	36
VIII. BIBLIOGRAFÍA	37

LISTA DE CUADROS

	Pág
Cuadro1. Distribución de bovinos según edad y procedencia. Puno, 2005.	27
Cuadro 2. Distribución de bovinos según procedencia y resultado a la Prueba MAT. Puno, 2005.	29
Cuadro 3. Distribución de bovinos según procedencia y resultado a la Prueba MAT. ILLPA- INIA. Puno, 2005.	30
Cuadro 4. Distribución de bovinos según procedencia y resultado a la Prueba MAT. Mañazo. Puno, 2005.	30

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad causada por una espiroqueta del género *Leptospira*. Es una zoonosis de distribución mundial que tiene gran impacto económico por importantes pérdidas que ocasiona en la ganadería sobretodo en la reproducción y la producción láctea, ya que tiene potencial abortivo y mortalidad neonatal, además de disminuir o anular la producción de leche. El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de leptospirosis en bovinos en dos predios del departamento de Puno la Estación Experimental de ILLPA- INIA y la Ganadería Cárdenas en la localidad de Mañazo, y su asociación con la época del año, la edad y sexo. Se evaluaron 116 muestras de suero en la época de seca, se recolectó muestra de sangre de la totalidad de hembras y machos de ambos predios, evaluándose mediante la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) para la detección de anticuerpos, empleándose una batería de cuatro serovares (*canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *hardjo*). Se obtuvo una prevalencia total de 2.6% del cual correspondió un 1.3% a animales de ILLPA- INIA y de 5.3% los animales de Mañazo. De los animales analizados se encontró que el serovar *icterohaemorrhagiae* fue el más prevalente con un nivel de anticuerpos de 1:200. Estos resultados sugieren una prevalencia baja de *Leptospira sp* en la época de seca en la zona estudiada.

Palabras claves: *Leptospira sp*, bovinos, MAT, seroprevalencia, anticuerpos.

SUMMARY

Leptospirosis is a disease caused by a spirochet of the genus *Leptospira*. Zoonosis is a world-wide distributed. It is zoonosis that has a huge economic impact because of the important loss that causes to stockbreeding, especially in terms of reproduction and milk production of the animals, given that it has an abortive potential, causes neonatal mortality, and decreases or annuls the production of milk. The goal of the present work was to estimate the prevalence of leptospirosis in bovines in two haciendas in the Department of Puno, the ILLPA-INIA Experimental Station and Livestock farming Cardenas, in the locality of Mañazo, and its association with the season of the year, age, and gender. One hundred and sixteen samples of serum were evaluated in the dry season; blood was collected from all the males and females from both haciendas and evaluated by the Microscopic Agglutination Test (MAT) for the detection of antibodies, using a set of four serovars (*canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, and *hardjo*). A total prevalence of 2.6% was obtained; 3.7% corresponded to animals of ILLPA-INIA and 15.4% to the animals of Mañazo. From the analyzed animals it was found that the serovar *icterohaemorrhagiae* was the most prevalent with a level of antibodies of 1:200. These results suggest a low prevalence of *Leptospira sp.* in the dry season in the area of study.

Key words: *Leptospira sp.*, bovines, MAT, seroprevalence, antibodies.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica que afecta tanto a animales como al ser humano, siendo este último hospedador incidental o accidental. Esta zoonosis es adquirida a través del contacto con reservorios animales o con ambientes contaminados por su orina (Faine, 1994). Es una enfermedad es endémica de varias especies de mamíferos que están en contacto directo con el hombre: canes, ganado y animales silvestres (Mazzonelli *et al.*, 1994), presentándose como una zoonosis de amplia distribución en el Perú y en el mundo (OIE, 2004). Si bien el impacto de la leptospirosis se aprecia con mayor intensidad en áreas templadas y tropicales, se reconoce también como un problema en zonas de climas fríos (Saraví *et al.*, 1991)

La leptospirosis es una de las enfermedades de mayor impacto económico por las grandes pérdidas que ocasiona en la ganadería o en animales de granja, en especial en bovinos, pérdidas ocasionadas por abortos, mortalidad perinatal, nacimiento de crías débiles, epidemias de abortos, esterilidad, y baja de producción láctea, que hacen que las pérdidas sean cuantiosas (Mazzonelli *et al.*, 1994; Radostits *et al.*, 2002).

Esta enfermedad es una zoonosis importante y es considerada una enfermedad ocupacional que afecta a personas que se dedican a la agricultura, limpieza de desagües, como carniceros, granjeros y veterinarios por el tipo de contacto que pueden tener con material infeccioso (Vinetz, 2001)

En los bovinos la enfermedad presenta una morbilidad alta, pudiendo sobrepasar el 75%, con una mortalidad del 5% o menos (Mauilloux, 1975). En animales jóvenes puede presentarse, aunque con poca frecuencia, un cuadro agudo grave que cursa con fiebre, ictericia, hemorragias y hemoglobinuria, que frecuentemente es de curso fatal (Alonso *et al.*, 2001).

La leptospirosis en bovinos es causada por bacterias que pertenecen al género *Leptospira*, ésta, integra dos especies: *Leptospira biflexia* y *L. interrogans*, cada una de las cuales comprende un gran número de tipos serológicos. La primera de ellas es saprófita, mientras que *L. interrogans* es parásita, causante de la leptospirosis, y

comprende más de 200 serovares (Faine, 1994) que a su vez están agrupados en serogrupos. Esta clasificación taxonómica está basada en acuerdo a sus características antigénicas (Luna *et al.*, 2005).

El panorama de la distribución de *L. interrogans* no es homogéneo, sus serovares sólo tienen carácter regional o zonal, individualización que se trata de un carácter de tipo geográfico condicionado principalmente a diferencias ecológicas, ambientales y distribución de reservorios, haciendo que las cepas de ciertos serovares adquieran una virulencia y una importancia que no se observa en otras regiones, aún cuando éstos están presentes en las mismas áreas (Saraví, 1991; Céspedes y Glenney, 2002).

En el Perú (Liceras e Higuchi, 1984) se han encontrado anticuerpos contra *Leptospira* en humanos y animales en 19 departamentos de los 24, además de la provincia constitucional del Callao. En la literatura se menciona una serie de factores asociados a la infección por *Leptospira* como: exposición a suelos y aguas contaminadas, características de las viviendas, eliminación de excretas, además la exposición con roedores y animales domésticos. Sin embargo, en el Perú hay pocos estudios orientados a identificar los factores de riesgo asociados a la infección por leptospirosis.

El objetivo del presente estudio fue conocer la situación de la leptospirosis bovina en nuestro país, específicamente en el departamento de Puno en época de seca, a fin de obtener datos estadísticos que muestren la prevalencia de esta enfermedad en el ganado bovino. Si bien, en la mayoría de los estudios se muestran prevalencias altas en zonas templadas o tropicales, la zona de Puno tiene ciertas características que serían aprovechadas por esta bacteria, además, permitirán observar las diferencias de estos datos en referencia con las épocas de lluvias.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

LEPTOSPIROSIS BOVINA

2.1 Etiología

La Leptospirosis en bovinos es causada por bacterias que pertenecen al género *Leptospira*, que comprende dos especies: *L. biflexia* y *L. interrogans* cada una de las cuales incluye un gran número de tipos serológicos. La primera es saprófita y se encuentran por lo común en el suelo y el agua, teniendo alrededor de 60 serovares (Guitian *et al.*, 2001; Plank y Dean, 2000; Yitzhaki *et al.*, 2004); mientras que *L. interrogans* es parásita de los animales y el hombre. Existen aproximadamente 230 serovares de *L. interrogans* y están agrupados en por lo menos 23 serogrupos determinados por los antígenos que comparten; la clasificación serológica depende de la diversidad estructural del lipopolisacárido (LPS) (De la Peña *et al.*, 2001).

Estas bacterias son filamentosas, delgadas, flexibles, constituidas por espirales finas con extremos doblados en forma de gancho. Tienen de 6 a 20 μm de longitud y ancho de 0,1 μm ; pudiendo atravesar filtros muy finos como de 0.45 μm de diámetro (Bharti *et al.*, 2003). Tienen un par de flagelos que se ubican en el espacio periplasmático, es decir entre la membrana citoplasmática y la membrana externa, los cuales ayudan a realizar los movimientos. Distinguiéndose por su activa movilidad, consecuencia de estiramiento y flexión del organismo, en tanto giran alrededor de su eje largo, estos pueden ser de: rotación alrededor del eje central; progresivo en dirección al extremo final y circular (Bharti *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 1997). Son aerobios obligados con una membrana citoplasmática y pared celular, rodeada por una membrana externa que contiene poros que permiten el intercambio de solución entre el espacio periplásmico y el medio ambiente (Plank y Dean, 2000).

La envoltura externa está formada por capas de lipopolisacárido y mucopéptido antigénico. El lipopolisacárido (LPS) es el mayor componente de la membrana externa; y es el antígeno protector específico del serovar. Se han identificado algunas lipoproteínas, tales como: LipL32 (conocido como Hap1) asociada a hemólisis, y es la proteína antigénica inmunodominante; LipL41, proteína de superficie; LipL36, proteína

reguladora; y proteínas de transmembrana como la porin OmpL1 (Haake *et al.*, 1999). La composición química de los LPS contienen rhamnosa, galactosa, arabinosa y xilosa como sus mayores componentes (De la Peña *et al.*, 2001). Recientemente se identificó que la proteína Hap1 asociada a la hemólisis se expresaba altamente en *Leptospiras* patógenas, pero no en las leptospiras saprófitas (Branger *et al.*, 2005).

Las leptospiras saprófitas y parásitas son semejantes. No es fácil observarlas con el microscopio óptico mediante las tinciones habituales, debido a sus pequeñas dimensiones y ser difícil de fijar y colorear. Por ello se hace preciso recurrir al microscopio de campo oscuro o de contraste de fases. Se cultiva con facilidad en medios artificiales. Puede sobrevivir largo tiempo en el agua o ambiente húmedo, templado, con pH neutro o ligeramente alcalino. Pueden conservar su vitalidad por varios días en vísceras y carnes refrigeradas; en el frío pueden sobrevivir hasta 100 días a -20°C (Aguinaga *et al.*, 2000). La luz solar directa, la desecación, hipersalinidad (agua de mar 18 - 24 h), desinfectantes, detergentes, jabón, jugos gástricos y pH ácido destruyen a esta bacteria (Zamora y Riedemann, 1999).

2.2 Epidemiología

Las infecciones por *Leptospira* se han propagado en los últimos años de tal manera que puede afirmarse que es la zoonosis más difundida en el mundo, sobre todo en zonas de clima tropical y áreas rurales, siendo fácil hallar la presencia de esta bacteria en lugares con inadecuadas condiciones de saneamiento y malos hábitos higiénicos. Las investigaciones serológicas y aislamientos de *Leptospiras* en muchos países de América han demostrado que las infecciones leptospirósicas en el humano y en los animales son muy frecuentes. En cuanto a los animales silvestres, éstos no son peligrosos por el riesgo de transmisión directa al hombre o a especies domésticas, sino por que actúan como portadores y diseminan en el ambiente leptospiras virulentas, y pueden ser hospedadores temporarios, crónicos y persistentes (Mazzonelli *et al.*, 1994).

El estudio epidemiológico de esta enfermedad es complejo, debido al gran número de factores que influyen en su presentación, lo cual dificulta la extrapolación entre las diferentes regiones, haciendo que se realicen investigaciones individualizadas

por continente, país o región. Las distintas cepas patógenas de *Leptospira* pueden afectar potencialmente a los mamíferos, ya sea ganado, animales de compañía, roedores o animales silvestres, comportándose en algunos casos como hospedadores temporales o reservorios, portadores crónicos y persistentes (Sandow y Ramírez, 2005). La presencia de mamíferos asintomáticos y de reservorios naturales como las ratas, constituyen un factor que predispone la prevalencia de enfermedad en el medio (Rivera *et al.*, 1999).

Es considerada una enfermedad ocupacional que afecta a personas que se dedican a la agricultura, limpieza de desagües, y a los que tienen contacto con los animales, como los veterinarios o camaleros (Céspedes y Glenn, 2002); así como a aquellas personas que desarrollan ciertas actividades recreativas que implican contacto con aguas posiblemente contaminadas. Además del riesgo sanitario, hay que tener en cuenta las pérdidas económicas derivados de gastos médicos, bajas laborales, caída de la producción láctea, pérdidas de crías y abortos, entre otros (Faine, 1991).

La infección suele ser subclínica, pudiendo ser éstos animales portadores por mucho tiempo, por otro lado la infección sintomática presenta fiebre, ictericia, hematuria, hemoglobinuria, niveles aumentados de albúmina y bilirrubina en la orina. Los animales jóvenes son más susceptibles (Jubb y Kennedy, 1974). Los signos clínicos desaparecen después de 12 a 14 días (Fernández, 1993).

La leptospirosis es la causa de importantes pérdidas económicas en los animales de granja, en especial a los bovinos asociadas a infecciones fetales que causan abortos, mortinatos nacimiento de crías débiles, epidemias de abortos, esterilidad, y baja de producción láctea hacen que las pérdidas sean cuantiosas (Radostits, *et al.*, 2002). Las vacas pueden presentar aborto principalmente al final de la gestación y decremento de la producción láctea con aumento de la densidad o agalactia (Fernández, 1993). En esta especie la enfermedad presenta una morbilidad alta que puede sobrepasar el 75%, con una mortalidad del 5% o menos (Mauloux, 1975).

Se han realizado diversos estudios en diferentes áreas y con muchas especies con el fin de tener noción de la frecuencia de presentación de esta enfermedad. Así, en nuestro país, el primer caso de Leptospirosis fue diagnosticado por Arce y Ribeyro (1917), en un hospital en Lima. Más adelante, algunos veterinarios realizaron estudios serológicos en un vacuno, un cerdo y un perro, encontrándose positivos a *L.*

icterohaemorrhagiae, *L. pomona* y *L. canicola* respectivamente, pero no fueron tipificados en Centros de Prevalencia (Vasallo *et al.*, 1968).

En 1955, el Instituto de Salud Pública de Lima realizó estudios epidemiológicos en ratas de desagües, gatos, perros y en cerdos sacrificados en el Frigorífico Nacional del Callao; el resultado fue el aislamiento de leptospiras pertenecientes a 5 serogrupos: *bataviae*, *tarassovi*, *canicola*, *pomona* e *icterohaemorrhagiae*, identificándose los serovares *paidjan*, *tarassovi* y *copenhageni* (Herrer *et al.*, 1957). Desde 1962 se investigó en otros departamentos del Perú y se aislaron 20 serogrupos, habiéndose identificado 43 serovares (Liceras e Higuchi, 1984).

En Venezuela, en 1980 se verificó que en 40.8% de 1562 abortos bovinos hubo participación de la leptospirosis y, en Irlanda en 1982 el serotipo *hardjo* se asoció con 49.7% de 348 abortos bovinos (Ellis y O'Brien, 1982).

En el año 1986, se examinaron mediante prueba de microaglutinación microscópica, 3088 sueros de bovinos provenientes de 4 regiones de Chile, los animales presentaban signos clínicos compatibles con leptospirosis, de los cuales 2585 (83.71%) reaccionaron y de éstos, 1583 (61.2%) mostraron títulos de significancia clínica. Los serogrupos más importantes fueron *L. pomona* y *L. sejroe*, sea por el mayor número de animales afectados, como también por encontrarse en todas las regiones y presentar títulos séricos más altos. Pero además, tuvieron importancia los serogrupos *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *tarssovi* y *ballum* (Riedemann *et al.*, 1986).

En la planta faenadora de Carnes de Valdivia (Zamora y Riedemann, 1999) se muestrearon 361 bovinos aparentemente sanos, obteniendo sangre de cada animal en el momento del sangrado y de riñón una vez faenado. Con esto se quiso investigar la presencia de anticuerpos séricos frente a *Leptospira*, intentándose el aislamiento de la bacteria en riñones; la aglutinación microscópica detectó que 162 (44.9%) animales eran reactores positivos a *Leptospira* principalmente a *hardjo* y *pomona*, lográndose el aislamiento de 50 (13.9%) cepas de los riñones examinados. Se constató que los 50 animales portadores (13.2%) carecían de anticuerpos anitleptospira y que 10 (20%) exhibían inmunoglobulinas sólo frente a serovares diferentes de las cepas aisladas, lo que podría deberse a fenómeno paradójico o a infecciones anteriores o mixtas.

Luna *et al.*, (2005) detectaron en la ciudad de México, anticuerpos de *L. interrogans* en hatos lecheros bovinos, encontrando que de los 116 sueros, 98 (84.48%) resultaron positivos y 18 negativos (15.52%) por la prueba de microaglutinación (MAT). La serovariedad con mayor número de serorreactores positivos fue *L. icterohaemorrhagiae*, con 53 de los 116 sueros (45.69%), siguiéndole *L. pyrogenes* con 25 (21.55%); *L. pomona* con 16 (13.8%); *L. canicola* y *L. celledoni* con 15 (12.93%) cada una. Otros autores, citados por Luna *et al.* (2005), realizaron similares estudios en diferentes estados y encontraron prevalencias distintas como Vásquez (1999), con una prevalencia de 77.77%, Dorantes (2001) 53.96%, Mendoza (2001) 42% y Álvarez (2002) 10%, además de los datos de prevalencia, cada uno halló diversas serovariedades de acuerdo a la región, pudiéndose observar que tres de estas serovariedades eran constantes, estas fueron *L. hardjo*, *L. pomona*, *L. canicola*.

En México, Luna *et al.* (1996), realizaron un estudio serológico de leptospirosis en fauna silvestre en cautiverio en zoológico de Chapultepec, los resultados indican que en 15 distintas especies hubo serorreactores positivos a 8 serovariedades y que el 52% de los sueros resultaron positivos. Las serovariedades identificadas fueron: *icterohaemorrhagiae* (40%), *canicola* y *pyrogenes* (26%), *hebdomadis* (23%), *pomona* y *grippotyphosa* (12%) *autunmalis* y *panama* (2%). Indicando que la leptospirosis es una enfermedad ampliamente difundida entre las colonias de animales y que hay una importante diversidad de serovariedades de *L. interrogans*.

En el mismo país, en 1999 se realizó un estudio en el cual se colectaron muestras de suero de 135 perros callejeros de edades variables y de sexo indistinto, una vez colectados se procedió a la prueba de microaglutinación contra 11 serovares de leptospirosis. Del total, 52 (38.51%) resultaron positivos a una o más serovariedades de leptospirosis, de las cuales las más importantes fueron *L. castellanis* (50%), *L. pyrogenes* (38.46%), *L. canicola* (26.92%) y *L. icterohaemorrhagiae* (21.15%); lo cual nos indica que el potencial que los perros callejeros tienen como portadores de leptospirosis patógenas es muy importante, ya que estos son el vehículo para mantener la prevalencia de leptospirosis entre la población canina y más importante aún el riesgo en Salud Pública (Rivera *et al.*, 1999).

Entre los años 1998 y 1999, se realizó una encuesta serológica al sur del Lago de Maracaibo (Venezuela), obteniéndose un 77.9% de seropositividad (de un total de 385 animales 300 resultaron con títulos significativos contra *Leptospira*), siendo los serovares más representativos *hardjo*, *australes* y *hebdomadis* de un total de 20 serotipos utilizados (Lugo *et al.*, 2001).

En Colombia, entre noviembre de 1997 y febrero de 1998, se realizó un estudio transversal para estimar la prevalencia de leptospirosis en poblaciones de operarios, bovinos y porcinos, además de explorar algunas variables ambientales y del sistema de producción asociados a la seropositividad, esta zona es de clima frío y existe un sistema de producción “cerdos- pastos- leche” que utiliza el estiércol del cerdo como fertilizante de las praderas de pastoreo, para este estudio se utilizó la prueba de microaglutinación para seis serotipos de *Leptospira*. Se estudiaron 23 granjas y se obtuvieron muestras de 67 operarios de lechería y porcicultura, de 174 vacas en producción y 68 cerdos de ceba y 214 de cría. La seropositividad en operarios fue de 22.4%, en cerdos en ceba de 10,3% y de 25,7% en cerdos de cría, en el caso de las vacas en producción fue de 60.9%, siendo en esta especie los serotipos más prevalentes *bratislava* (48.3%) y *hardjo* (30.5%) esto es relevante por ser ambos de gran importancia en la salud animal y humana, los títulos oscilaron entre 1:25 y 1:1600 para todos los serotipos (Ochoa, 2000).

En el 2002 Sepúlveda *et al.*, (México) realizaron un estudio para destacar la importancia que tienen los roedores y canes domésticos en la diseminación de la leptospirosis en establos y granjas de Jalisco. Se utilizaron 13 serovares, aplicando como medio diagnóstico la prueba de microaglutinación en placa (MAT). Se muestrearon 354 ratas (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*) que fueron capturadas en las cercanías de estos establecimientos, y 419 caninos de la región, resultando que 22 (6.2%) de las ratas fueron positivas y 34 (9.6%) sospechosas, en cuanto a los perros 95 (22.6%) de ellos fueron positivos y 24 (5.7%) sospechosos a *L. interrogans*. Esto indica que ambas especies son fuentes importantes de diseminación de la enfermedad dentro de los establecimientos ganaderos.

La leptospirosis es una enfermedad de los animales, la infección humana es accidental y resulta del contacto con alimentos, agua u otros materiales contaminados

con las excreciones de hospedadores animales. La principal fuente de infección para el hombre son las ratas, roedores silvestres, los perros, cerdos y bovinos, estos animales excretan la *Leptospira* por la orina y las heces fecales; tanto durante la enfermedad activa, como en el período de portador asintomático. Las leptospiras permanecen viables en aguas estancadas durante varias semanas, por lo tanto el hecho de beber, nadar o bañarse pueden promover la infección en el hombre (Mazonelli *et al.*, 1994)

2.3 Modo de transmisión y fuentes de infección

La forma de transmisión más importante en el caso de los bovinos es la horizontal directa, siendo *hardjo* el serovar adaptado, mientras que la transmisión horizontal indirecta tiene un papel más importante en las infecciones accidentales y se produce tras la exposición del animal a un ambiente contaminado con material infectado, si los animales excretores se introducen en un rebaño previamente libre de la enfermedad, la leptospira se disemina rápidamente (Ellis, 1994; Laguna, 2000; Lomar *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2001).

La fuente de infección más común es un animal infectado que contamina el pasto, el agua o la comida por orina infectada, los fetos abortados y las secreciones uterinas; todos los tipos de *Leptospira* se transmiten dentro y entre especies de esta manera. Un neonato infectado viable puede poseer la infección durante varias semanas después del nacimiento. El semen de un toro infectado puede contener *Leptospiras* y la transmisión por la reproducción natural o la inseminación artificial puede producirse, pero es infrecuente. *L. interrogans* serovariedad *hardjo* se elimina por el aparato genital de las vacas que abortan durante un periodo de hasta 8 días después del aborto o el parto y se detecta en los oviductos y en el útero hasta 90 días después de la infección experimental y en vacas infectadas naturalmente; también puede estar presente en el aparato genital de los toros y es posible la transmisión venérea de la infección (Radostits *et al.*, 2002).

Las leptospiras se transmiten entre animales por contacto directo o indirecto. La transmisión directa ocurre principalmente con la entrada de leptospiras por vía inhalatoria o conjuntival, procedentes de gotas formadas por dispersión de la orina de animales infectados (Lomar *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2001), la transmisión venérea no ha sido demostrada en algunas especies, aunque podría ser fundamental en algunas

especies cuyos hábitats se encuentran en áreas de características o de densidad poblacional desfavorables para transmisión de la enfermedad de manera indirecta (Ochoa *et al.*, 2000), y se ha descrito la transmisión vertical, tanto transplacentaria como galactófora (Alonso *et al.*, 2001; Fowler, 2003). Las heridas por mordedura o ingestión de tejidos infectados son también fuentes de infección directa (Greene, 2000). La diseminación directa de la infección aumenta por el hacinamiento de los animales como en el que puede observarse en establos con producción intensiva o semiextensiva. Los animales que se recuperan excretan el microorganismo por la orina en forma intermitente durante meses después de la infección. Las *Leptospiras* no se replican una vez que se hallan fuera del hospedador (Alonso *et al.*, 2001).

La transmisión indirecta es la más frecuente en los brotes de la enfermedad, tanto en el hombre como en los animales y ocurre por contacto de la piel o mucosas con material contaminados con orina infectada (Laguna, 2000); exposición de animales susceptibles a fuentes de agua, suelo, alimento contaminados. Aunque se comprobó que las espiroquetas sobreviven en insectos y otros hospedadores invertebrados, se desconoce la importancia de este hecho respecto a la transmisión de la enfermedad. La transmisión indirecta de leptospiras puede aumentar cuando los factores ambientales que favorecen la supervivencia de *Leptospira* son óptimos (Greene, 2000).

El problema epidemiológico, donde los bovinos juegan un rol destacado, puede resumirse en tres presentaciones (Mazzonelli *et al.*, 1994):

- Transmisión de la infección entre los mismos animales de una explotación agrícola ganadera, siendo esta transmisión:

- Congénita o neonatal, la cual genera un portador.
- El portador, a través de su orina, contamina aguas de bebida, campos, etc.

- Relación roedores - animales domésticos. Los roedores se contagian entre sí por distintas vías, y son, a su vez, fuente de infección para los animales domésticos.

- Transmisión entre los animales domésticos, roedores y el agua, el esquema epidemiológico señalado anteriormente se amplía al actuar el agua (de cursos naturales, estancadas, de inundación, etc.) como vehículo de transmisión de leptospiras.

2.3.1 Factores asociados a la infección

De acuerdo con la literatura, hay tres componentes asociados con la infección, los factores relacionados al agente etiológico, los que están relacionados al hospedador y los factores del medio ambiente que influyen en el hospedador.

A. Factores dependientes del agente etiológico

La resistencia de la bacteria fuera del hospedador es uno de los factores de mayor importancia. Estas son bastante sensibles a las condiciones ambientales o cambios climáticos (Van der Hoeden, 1958; Michna, 1970; citados por Alonso *et al.*, 2001). Las espiroquetas sólo viven de manera temporal en la orina ácida no diluida (pH 5.0 a 5.5), en tanto que las condiciones opuestas proporcionan hábitat más adecuados (neutro o ligeramente alcalino). Temperaturas ambientales entre 0° y 25° C, aunque otros autores aseguran que podrían estar a temperaturas que varíen de 7 a 10° C y entre 34 a 37° C, (Radostits *et al.*, 2002); favorecerían la supervivencia y replicación de leptospiras, mientras el enfriamiento disminuye de manera notable la supervivencia. Otras son el ambiente húmedo y presencia de materia orgánica. Aunque no es esencial, el agua caliente estancada o con movimiento lento proporciona un hábitat adecuado para las espiroquetas. En consecuencia los brotes de la enfermedad suelen aumentar en los períodos de inundaciones (Greene, 2000). Se dice que puede persistir hasta 183 días en un lecho de agua, pero sólo 30 minutos en un suelo seco, además que la supervivencia de esta bacteria es mucho mayor en aguas estancadas que el corrientes (Radostits *et al.*, 2002).

B. Factores dependientes del hospedador

Dentro de los factores de mayor importancia se encuentra la **edad**, que tiene relación con el estado de portador renal. Según investigaciones se sugiere que animales de corta edad son leptospirúricos a diferencia de vacas mayores de tres años, en las que no se encuentran evidencias de éstas bacterias en la orina (Ellis, 1982 citado por Alonso *et al.*, 2001). En cuanto a la **inmunidad**, se sabe que el ganado expuesto anteriormente a la infección es refractario a la reinfección durante largos períodos de tiempo, incluso cuando los niveles de anticuerpos circulantes sean mínimos y apenas alcancen un título

de 1:10 (Ellis, 1983, citado por Alonso *et al.*, 2001). Otro aspecto importante es la **gestación**, ya que esta bacteria provoca abortos principalmente en el último trimestre ya que probablemente la infección se produce varias semanas antes y el aborto sucede 1 a 6 semanas después de la fase aguda en caso de serovares accidentales y en el caso de una infección con *L. hardjo* a las 4 a 12 semanas, aunque los animales no suelen presentar signos clínicos; también se han observado abortos en otros períodos de la gestación e incluso mortalidad embrionaria (Ellis, 1983, citado por Alonso *et al.*, 2001). Otros factores que podrían sumarse a la infección son la compra de ganado o macho reproductor infectado, compartir pasturas con animales infectados y acceso del ganado a fuentes de agua contaminada (Radostits *et al.*, 2002)

C. Factores dependientes del medio ambiente

En este punto cabe resaltar el **manejo**, así tenemos que las explotaciones lecheras intensivas y semi-extensivas, permiten un mayor contacto entre animales por ende la transmisión es mucho mas fácil; y en el caso de explotaciones extensivas o semi-extensivas también existe riesgos debido a que el ganado se encuentra copastando con otros animales como ovejas y posible contacto con animales silvestres teniendo acceso libre a fuentes de agua y pasturas contaminadas, entonces existe un mayor riesgo de contagiarse (Alonso-Andicoberry *et al.*, 2001). Otro factor sería la introducción de animales que no han sido expuestos a la bacteria se da ya que las crías son separadas al nacer y reintroducidas al rebaño siendo éstos totalmente receptivos a la infección (tasas de infección más altas entre los 2 a 3 años de edad) (Ellis 1983, citado por Alonso *et al.*, 2001). La alimentación con suplementos como los ensilados de grano, produce una baja del pH de la orina, lo que genera la disminución del número de leptospiras viables eliminadas en este fluido (Leonard *et al.* 1992). En estaciones de lluvia, existe mayor predisposición de presentación de la enfermedad, generalmente en países tropicales y subtropicales siendo una enfermedad endémica (Levett, 2001).

2.4 Patogenia e inmunidad

Las leptospiras son muy invasivas debido a la producción de enzimas LPS, GLP, peptidoglican, hialuronidasas, fosfolipasas, lipasas, hemolisinas, además, del factor

mecánico de los flagelos que provocan la motilidad por excavación, y otros componentes pueden contribuir en la patogénesis de la enfermedad, pero no están totalmente esclarecidos (Lee *et al.*, 2002; Plank y Dean, 2000). Estas causas se han sugerido como mecanismos por los que la bacteria alcanza sitios normalmente protegidos por el organismo, como el líquido cefalorraquídeo y el globo ocular.

Las leptospiras penetran en el organismo animal mediante la ingestión de alimentos o agua contaminados; o a través de las membranas mucosas orales, nasales, del pene y especialmente la conjuntival y vaginal; o a través de piel lesionada o reblandecida por el agua teniendo un período de incubación promedio de 12 días (Llorente *et al.*, 2002). Las bacterias se difunden, invaden y vía linfática llegan al torrente sanguíneo, multiplicándose y circulando en la sangre, provocando leptospiremia por al menos 7 días (Ellis, 1994). Esta invasión bacteriana produce pirexia, eliminación de leptospiras en la leche, anorexia, daño funcional de algunos órganos en especial órganos de filtración como el hígado, riñón y pulmón; sin embargo, abarca órganos como el bazo cerebro, globo ocular y placenta, especialmente en animales jóvenes (Sandow y Ramírez, 2005). La respuesta humoral es una de las principales respuestas del cuerpo contra la *Leptospira*; y tiene gran utilidad para establecer un diagnóstico en el caso de la infección por serovariedades no adaptadas. El aumento de Ig M es la respuesta serológica inicial y ésta es detectada a los pocos días de la infección, luego desciende progresivamente hasta niveles indetectables (Atxaerandio *et al.*, 2002). Las IgM retardan proliferación de las espiroquetas, pero no las destruyen, entre la tercera y cuarta semana alcanzan su pico máximo (Sandow y Ramírez, 2005).

Es posible encontrar leptospiras que persistan en órganos como la cámara anterior del ojo, las meninges, y en el riñón ya que las leptospiras muestran tropismo por células de los endotelios vasculares y especialmente por epitelios de los túbulos renales, además de ser facilitada por la producción de ureasa proveniente de estas bacterias (Kadis y Pugh, 1974). Los anticuerpos tienen poco acceso a estas zonas, además, pueden invadir tramos del tracto genital, y en el caso de un útero grávido, pueden provocar abortos (Atxaerandio *et al.*, 2002). Los niveles de citoquinas y factor de necrosis tumoral (TNF- α) están elevados en la leptospirosis severa y en fases agudas

de la enfermedad el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se eleva y está asociado a la severidad de la enfermedad (Diament *et al.*, 2002).

Una vez que se sitúan en el riñón es difícil el acceso de los anticuerpos, los organismos penetran el endotelio vascular, persisten brevemente en los espacios intersticiales e ingresan a la luz tubular y una vez allí colonizan la zona apical de los túbulos proximales principalmente en la microvellosidades donde la nefritis intersticial provocada por el daño capilar, producción de determinadas endotoxinas y hemofilinas, además del infiltrado celular, que está constituido por linfocitos, monocitos, células plasmáticas y algunos neutrófilos. Esto ocurre aproximadamente a los 28 días postinfección (Atxaerandio *et al.*, 2002; Thompson y Manktelow, 1989) y terminan por producir anoxia del tejido renal y hemoglobinuria, por la posible isquemia debida a la agregación intravascular de hemoglobina que obstruiría los capilares y también por la presencia de mononucleares infiltrados por una reacción autoinmune (Thompson y Manktelow, 1989), lo que da lugar a la tercera fase: leptospiuria que puede tener carácter continuo o intermitente y de duración variable según la especie afectada (Jawetz *et al.*, 1985; Ellis, 1994 citados por Sandow y Ramírez, 2005). El grado de daño a los órganos internos varía según la virulencia del microorganismo y la susceptibilidad del hospedador (Midwinter *et al.*, 1994). Puede ocurrir más de una forma en un animal específico y las manifestaciones clínicas varían entre brotes y áreas geográficas con un serovar determinado (Brown *et al.*, 1996 y Harkin *et al.*, 1996)

La leptospiuria o eliminación de las bacterias por orina en bovinos puede estar presente hasta 7 meses, mientras que el equino por ejemplo de 2-3 meses, el cerdo hasta un año; el perro hasta 6 meses o más; roedores toda la vida (Jawetz *et al.*, 1985, citado por Sandow y Ramírez, 2005).

El hígado es otro importante órgano afectado; las *Leptospiras* invaden los sinusoides, el espacio Disse y el parénquima; posible ruptura de canículos con liberación de bilis hacia el sistema circulatorio, lo que daría como consecuencia una hiperbilirrubinemia, habiendo también destrucción de hepatocitos (Plank y Dean, 2000). Las funciones hepáticas disminuyen y, con la destrucción de parénquima hepático hay elevación de los niveles de enzimas hepáticas (Higgins *et al.*, 1980; Marangoni *et al.*,

2004); también se pueden describir hemorragia focal y petequiral, edema intersticial y focos necróticos (Plank y Dean, 2000).

Alrededor de la segunda semana, con la aparición de anticuerpos se puede presentar meningitis, pero sin que se logre aislar la bacteria; lo que sugiere que la meningitis se produce a la reacción antígeno-anticuerpo (Arbey *et al.*, 1998). La presencia de *Leptospiras* en el ojo que generan una inflamación no granulomatosa, donde están involucrados el iris, córnea, humor vítreo, cámara anterior (Faber *et al.*, 2000; Lucchesi y Parma, 1999). Los fluidos oculares con uveítis contienen altos niveles de IgA e IgG que son específicos para cada proteína, indicando así una fuerte respuesta local de anticuerpos. Sin embargo, estas proteínas reaccionan con los componentes oculares sugiriendo así un rol inmunopatogénico en la uveítis leptospiral (Verma *et al.*, 2005)

Uno de los puntos clave de infección, después de una invasión sistémica, es la placenta (en el caso que sea una hembra en gestación) produciendo enfermedad fetal y aborto con o sin degeneración placentaria; el filtrado de las leptospiras a través de la placenta facilita los cambios degenerativos en la última etapa de gestación (Alfaro *et al.*, 2004); pero puede ocurrir en cualquier momento desde del cuarto mes (Radostits *et al.*, 2002). El aborto, generalmente se produce varias semanas después de la infección y representa la expulsión del feto, que generalmente está autolizado. Los riñones en el feto están afectados con tumefacciones, edema y estrías blanquecinas. Por otro lado, se puede observar hepatomegalia e ictericia; en las cavidades corporales se observa líquido serosanguinolento. Las lesiones más evidentes se observan en la membrana corioalantoidea, que se torna verdosa y hay presencia de masas nodulares quísticas; las membranas amnióticas y el cordón umbilical presentan edema y áreas de necrosis (Córdova, 2006; Jubb y Kennedy, 1974).

Las IgG específicas, son aquellos que inhiben la multiplicación de *leptospiras*, son anticuerpos que pueden persistir durante años en el animal, alcanzándose el pico de anticuerpos entre las cuatro y las doce semanas de infección (Sandow y Ramírez, 2005).

La primera respuesta serológica en caso de infección por *L. hardjo* es la producción de inmunoglobulinas M (IgM). Estos anticuerpos aumentan rápidamente pero normalmente descienden hasta concentraciones no detectables a las 4 semanas de la infección. Al cabo de 1 a 2 semanas de la infección, se detectan los anticuerpos IgG y a los 3 meses, representan el 80% de los anticuerpos detectados en la prueba de aglutinación microscópica (MAT) (Radostits *et al.*, 2002). La inmunidad naturalmente adquirida que protege contra reinfecciones es principalmente humoral, ésta genera anticuerpos directamente contra el serovar específico de los LPS leptospirales (Bharti *et al.*, 2003). En la mayoría de los casos, en el momento del aborto los niveles de anticuerpos son bajos, incluso negativos, lo que conduce a dificultad a la hora de realizar el diagnóstico de los abortos por leptospiras (Sandow y Ramírez, 2005).

2.5 Signos clínicos

La leptospirosis en la mayoría de las especies animales, incluyendo al hombre, tiene un amplio rango de manifestaciones sintomatológicas pudiendo variar desde eventos febriles hasta cuadros multisintomáticos que incluyen trastornos a nivel hepático, renal, neurológicos y sobretodo reproductivos (Luna *et al.*, 2005).

Estas manifestaciones clínicas dependen de un abanico de factores, que en el caso del factor hospedador varían con la edad, estadio reproductivo teniendo mayor repercusión durante la preñez, las vacunas serían un factor protector, el contacto con animales infectados o silvestres hacen más susceptibles al ganado; en tanto la resistencia de la bacteria y el serovar involucrado hacen variar las manifestaciones clínicas (Lomar *et al.*, 2000). El medio ambiente también tiene importancia ya que si la bacteria encuentra el ambiente propicio puede estar latente a la espera de su hospedador.

Las infecciones por *Leptospira spp* son en gran porcentaje subclínicas, aunque eventualmente se dan casos de enfermedad grave. La sintomatología es inespecífica y común para muchas enfermedades infecciosas. Se puede observar ictericia, hemoglobinuria, hematuria, daño renal, meningitis y la mortalidad (Ellis, 1994). La pirexia continua puede causar el aborto a las hembras preñadas (Michna, 1970, citado por Alonso *et al.* 2001). La producción láctea se ve muy afectada, y prácticamente desaparece y ésta puede contener coágulos de sangre y el recuento de células blancas es

muy alto. También podemos encontrar, pero en menor porcentaje las infecciones crónicas que se ven reflejados por fallos reproductivos tales como la infertilidad (abortos, mortinatos), nacimiento de terneros prematuros, retención de placenta, e incluso esterilidad, en casos extremos (Alonso *et al.* 2001). Pero las lesiones no son patognomónicas, siendo de escasa utilidad para el diagnóstico de la enfermedad (Baskerville, 1986 citado por Alonso *et al.* 2001).

En los animales adultos, las lesiones se localizan principalmente en los riñones. También, se pueden encontrar lesiones en el hígado, útero, placenta y, en algunos casos, en pulmones y bazo. Pero en todos estos órganos, las características de las lesiones van a depender del serovar implicado (Thiermann, 1982; Skilbeck *et al.*, 1988). En el feto, las lesiones son realmente difíciles de interpretar pues pueden confundirse con los procesos normales de autólisis (Ellis, 1994). Y en los terneros, la enfermedad es más severa, al inicio presentan fiebre de 41°C, anorexia, depresión, ictericia, septicemia, anemia hemolítica, hemoglobinuria, meningitis, alta mortalidad, así como retraso en el crecimiento (Alfaro *et al.*, 2004; Guijarro y Calvo, 1999; Jubb y Kennedy, 1974). La leptospirosis aguda con *L. pomona* es más frecuente en los terneros pero se puede ver en las vacas lecheras adultas (Radostits *et al.*, 2002 y Rebhun, 1999).

Las infecciones crónicas casi siempre están relacionadas con *L. hardjo* y en algunos casos con *L. pomona*, sin manifestación clínica (Radostits *et al.*, 2002). Caracterizada por la aparición de abortos en el último trimestre de la gestación, los fetos infectados en el útero durante las fases terminales pueden nacer débiles o muertos (autolisados). Los animales infectados pueden eliminar el organismo en su orina durante un período de 28 a 40 semanas (Rebhun, 1999).

2.6 Diagnóstico

Actualmente existen gran variedad de pruebas diagnósticas a nuestra disposición desde pruebas relativamente sencillas hasta las que requieren instrumental y maquinarias muy modernas y precisas. El aislamiento e identificación de leptospiras en sangre u orina o la detección de anticuerpos en el suero son las bases fundamentales de todas las pruebas diagnósticas (Aslantas y Özdemir, 2005).

El uso, la interpretación y el valor de los procedimientos de diagnóstico de laboratorio para la leptospirosis varían según la historia clínica del animal o del rebaño, la duración de la infección y de la serovariedad infectante. La localización y la persistencia de leptospira en el riñón y en el tracto genital de los animales son dos secuelas microbiológicas crónicas importantes de la infección por leptospirosis que presentan problemas de diagnóstico concretos. Los animales infectados crónicamente pueden ser portadores durante toda la vida y servir de reservorios de la infección para otros animales y para los humanos (OIE, 2004).

2.6.1 Identificación del agente

La demostración de la presencia de leptospirosis en sangre y la leche de los animales que muestran signos clínicos que sugieren leptospirosis aguda tiene valor diagnóstico. Sin embargo, el aislamiento a partir de la sangre no es siempre satisfactorio, por que la bacteriemia es pasajera y no siempre se acompaña de signos clínicos. La demostración de leptospirosis en el tracto genital, los riñones o la orina sólo debe interpretarse en conjunto los signos clínicos y los resultados serológicos, ya que estos hallazgos puede que sólo indiquen que el animal era portador (OIE, 2004).

El fallo en la demostración de la presencia de leptospirosis en la orina de un animal no descarta la posibilidad de que éste, sea portador renal crónico, sólo indica que el animal no excretaba cantidades detectables de leptospirosis en el momento del examen. La toma de orina después del tratamiento con diuréticos aumentara las posibilidades de detectar el organismo (Radostits *et al.*, 2002).

La demostración de las leptospirosis en los fluidos corporales o en órganos internos (normalmente en el riñón, el hígado, el pulmón, el cerebro o la glándula adrenal) de fetos abortados o nacidos muertos tiene valor diagnóstico de la leptospirosis crónica de la madre, y es una evidencia de la infección activa del feto (Aguinaga *et al.*, 2000).

A. Cultivo

El aislamiento de leptospiras es el método más sensible de la demostración de su presencia siempre que no haya residuos de antibióticos, ni autólisis avanzada del tejido, que los tejidos se manejen con rapidez para realizar cultivos después de su recogida, y en el caso de la orina que tenga un pH adecuado. Si los tejidos o fluidos no se pueden enviar al laboratorio inmediatamente para la realización de un cultivo de leptospiras, la muestra se conservara a 4°C para impedir el crecimiento excesivo de otras bacterias y la autólisis de las muestras de tejido. Como medios de transporte para el envío de las muestras deben emplearse medio de cultivo líquido o solución al 1% de albúmina sérica (BSA) con 5-fluorouracilo a una concentración de 100- 200 ug/ml (Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2001).

El cultivo debe realizarse en un medio semisólido (0,1-0,2% agar) con BSA y a una temperatura de 29 +/- 1°C al menos durante 16 semanas y preferentemente durante 26 semanas. El tiempo que se necesita para la detección de un cultivo positivo varía con la serovariedad de la leptospira y el número de organismos presentes en la muestra, las serovariedades menos exigentes (por ejemplo *Leptospira pomona* y *Leptospira grippotyphosa*) pueden dar resultados positivos tan pronto como entre 7 a 10 días después de la inoculación; otra serovariedades (por ejemplo *Leptospira hardjo* y *Leptospira bratislava*) pueden tardar mucho más tiempo. Los cultivos deben examinarse con un microscopio de campo oscuro cada 1-2 semanas (Aguinaga *et al.*, 2000).

La desventaja del cultivo es que se requiere de varias semanas de incubación; tiene baja sensibilidad, por lo tanto no es útil para el diagnóstico oportuno (Céspedes y Glenny, 2002; Costa *et al.*, 2006).

B. Inmunofluorescencia

Es una técnica de tinción inmunohistoquímica, es muy útil para diagnosticar infección en material patológico que es inadecuado para la realización de cultivos o donde se requiere diagnóstico rápido. El éxito de estas pruebas depende del número de organismos presentes, son menos apropiadas para diagnosticar el estado de portador crónico, donde el número de organismos puede ser muy bajo o localizado (OIE, 2004).

C. Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)

Estos ensayos se emplean en la actualidad en algunos laboratorios de diagnóstico y en la mayoría de laboratorios de referencia para la detección de leptospiras en tejidos y fluidos corporales. Se han descrito diferentes juegos de cebadores o promotores para la realización de ensayos de PCR, con algunos cebadores específicos para el género *Leptospira* y otros que son específicos de serovariedad (Ciceroni *et al.*, 2002). Los ensayos de PCR pueden ser bastante sensibles, pero la carencia de especificidad puede presentar un problema (Plank y Dean, 2000; Richtzenhain *et al.*, 2002).

2.6.2 Pruebas serológicas

Constituyen el procedimiento de laboratorio utilizado con más frecuencia para confirmar el diagnóstico clínico, para determinar la prevalencia en el hato y para realizar los estudios epidemiológicos. Los anticuerpos de la *Leptospira* aparecen a los pocos días del comienzo de la enfermedad y persisten durante semanas o meses, y en algunos casos años. Desafortunadamente, los títulos de anticuerpos pueden que caigan hasta niveles indetectables mientras los animales permanecen infectados crónicamente, para superar este problema, se necesitan métodos sensibles que detecten el organismo en la orina o en el tracto genital de portadores crónicos.

Se ha descrito una amplia variedad de pruebas serológicas que muestran grados variables de especificidad de serogrupo y de serovariedad. La prueba de aglutinación microscópica (MAT) y el enzimoimmunoensayo (ELISA) contribuyen al diagnóstico veterinario.

A. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)

Es la prueba serológica más ampliamente utilizada. Constituye la prueba de referencia frente a las que se evalúan todas las otras pruebas serológicas y se utiliza en las comprobaciones para importación y exportación de animales siendo ésta la prueba oficial (OIE., 1992, citado por Alonso *et al.* 2001). En esta prueba se emplean antígenos

vivos siendo tedioso el mantenimiento de las cepas y un riesgo potencial para el personal del laboratorio las cuales serían unas de las mayores desventajas. Para obtener una sensibilidad óptima deben emplearse antígenos representativos de todos los serogrupos conocidos que existen en la región en la que han encontrado los animales, y preferiblemente, cepas que representen a todos los serogrupos conocidos (Ellis, 1986 citado por Alonso *et al.* 2001). La presencia de un serogrupo normalmente viene indicada por la reacción frecuente en la selección serológica o en el aislamiento de una serovariedad procedente de unos animales afectados clínicamente. La especificidad del MAT es buena: normalmente los anticuerpos frente a otras bacterias no dan reacción cruzada con *Leptospira* de manera significativa (Arbey *et al.*, 1998). Sin embargo existe reacción cruzada serológica significativa entre las serovariedades de *Leptospira* y es probable que un animal infectado con una serovariedad tenga anticuerpos frente a la serovariedad infectante que de reacción cruzada con otras serovariedades (normalmente aun nivel mas bajo) en la MAT. Además, los animales que han sido vacunados contra leptospirosis pueden tener anticuerpos frente a serovariedades presentes en la vacuna utilizada. Por tanto, es especialmente importante considerar el historial de vacunación de animales objeto de estudio (Perret *et al.*, 2005).

Para realizar la prueba se requieren sueros obtenidos de animales a estudiar que reaccionan con suspensiones vivas del antígeno de serovares leptospirales. La prueba consiste en la mezcla de diluciones seriadas del suero de animales con cultivos de *Leptospira* de distintos serovares en placas de microtitulación o en tubos. Las mezclas de suero con los antígenos de *Leptospira* se dejan reaccionar por 2 horas a 28 a 30°C. El grado de aglutinación y el título final se determina examinando cada mezcla por microscopía de campo oscuro (Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2001; Perret *et al.*, 2005). Son positivos los títulos de 1:100 o mayores; el punto final de la lectura es la dilución más alta del suero en la cual ocurre el 50% de aglutinación (Arbey *et al.*, 1998; Levett, 2001). Una respuesta de anticuerpos específicos detectables por la MAT ocurre generalmente alrededor de los 8 a 10 días después que se ha establecido la enfermedad (Smythe *et al.*, 2002). La sensibilidad de la MAT es variable, dependiendo del número de serovares incluidos en el panel. Un resultado puede ser falsamente negativo si el serovar infectante no se encuentra dentro de los antígenos utilizados para la prueba (Perret *et al.*, 2005). El valor de esta prueba es la capacidad de detectar anticuerpos

contra serovares específicos; sin embargo, puede ocurrir reacción cruzada entre serovares relacionados (Cermeno *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006).

B. Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (ELISA)

Es una de las pruebas laboratoriales que se encuentran con mayor sensibilidad. Esta prueba detecta anticuerpos, ya sea en sangre o leche permitiendo además diferenciar entre IgG e IgM (Thiermann, 1983). Pueden ser realizadas usando una simple preparación antigénica. Sin embargo, un número importante de diferentes procedimientos han sido descritos para el desarrollo del ELISA, así como diferentes preparaciones antigénicas, conjugados a distintas enzimas y distintos sistemas de detección; es así que la preparación antigénica es el elemento fundamental que podrá hacer variar la sensibilidad y especificidad de esta técnica (Arias *et al.*, 1999)

Una de sus mayores ventajas frente al MAT, es que no presenta riesgo sanitario para los operarios ya que no trabaja con leptospiras vivas, otro punto es que es fácil estandarizar y es una prueba en la que las reacciones cruzadas son poco frecuentes (Aslantas y Özdemir, 2005).

Por su rapidez, la prueba de ELISA permite una confirmación diagnóstica rápida y segura, útil también en situaciones epidémicas o brotes, posibilitando dirigir medidas de vigilancia y control epidemiológico, ya que permite procesar una gran cantidad de muestras en poco tiempo (Céspedes y Glenney, 2002; Lottersberger *et al.*, 2002)

Se han desarrollado ensayos ELISA para la detección de anticuerpos de la serovariedad *L. hardjo* en la leche de vacas aisladas o en un tanque de almacenamiento de leche. Estas pruebas han sido útiles en la identificación de rebaños infectados por *L. hardjo*. Sin embargo, los rebaños que están vacunados frente a la serovariedad *L. hardjo* también darán resultados positivos en estos diferentes ELISA disminuyendo su utilidad en las regiones donde la vacunación es una práctica de rutina (Arias *et al.*, 1999).

C. Hemoaglutinación indirecta

Esta prueba determina anticuerpos totales IgM e IgG, por lo que no permite diferenciar infección reciente de pasada. Es útil para estudios de seroprevalencia;

presenta una sensibilidad de 92% y una especificidad de 97% respecto del MAT (Perret *et al.*, 2005; Plank y Dean, 2000). La hemaglutinación indirecta (MRL Diagnostics®, Ca) utiliza eritrocitos sensibilizados con antígeno derivado de *Leptospira biflexa* cepa Patoc 1. Cuando existen anticuerpos en el suero del paciente (IgG o IgM) ocurre una aglutinación de los glóbulos rojos. Utiliza eritrocitos no sensibilizados como control para evaluar reacciones inespecíficas. Se comienza con una dilución inicial 1:50 y de ser positivo, se realizan diluciones seriadas hasta determinar la dilución límite de positividad (Perret *et al.*, 2005).

D. Test de Aglutinación en Látex (LAT)

Detecta anticuerpos leptospirales en muestras animales y humanas. La prueba se realiza en láminas de cristal donde se mezclan volúmenes iguales de suero y granos de látex sensibilizados. La lámina se mueve suavemente por 5 a 10 minutos. Se utiliza el PBS y suero normal de conejo como controles negativos y el suero hiperinmune de conejo anti leptospira se utiliza como control positivo. LAT ha demostrado ser una prueba rápida (2 a 10 min.), simple, no requiere experiencia ni equipo sofisticado (Ramadass *et al.*, 1999; Smits *et al.*, 2000). Se realizó un estudio comparando LAT y ELISA, empleándose 65 muestras de animales (bovinos y perros), de los cuales 41 muestras fueron positivas para LAT (63.1%) y 45 muestras en ELISA (69.2%) (Ramadass *et al.*, 1999)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

3.1.1. Ubicación

La investigación se realizó en el departamento de Puno, provincia de Puno, en el predio del INIA-Puno, ubicado a una latitud de 15°50'15'', Longitud 70°01'18'' y altitud 3 827 m.s.n.m. y en la localidad de Mañazo ubicada a una Latitud 15°47'54'', Longitud 70°20'28'' y Altitud 3 926 m.s.n.m.

3.1.2. Animales

La población estudiada, estuvo conformada por la totalidad de hembras y machos de la Estación Experimental del INIA-Puno y de la Ganadería Cárdenas de la localidad de Mañazo-Puno, con un total de 116 animales, cuyas edades fluctúan entre los 3 meses y 8 años, la procedencia de los animales es local, predominando la raza Brown Swiss. En ambos casos el tipo de explotación es extensiva (alimentación a base de pastos, agua de aseQUIAS y riachuelos).

Cuadro 1 Distribución de bovinos según edad y procedencia en época seca, Puno, 2005.

EDAD (años)	PROCEDENCIA		TOTAL
	ILLPA	MAÑAZO	
Menos de 2	28	19	47
De 2 a 4	23	13	36
Más de 4	27	6	33
TOTAL	78	38	116

3.1.3. Clima

La temperatura media en la zona durante la época de seca (junio a septiembre) es de -5°C , habiendo zonas que pueden llegar a los -10°C . (Miranda, 1998).

3.1.4. Características de los hatos

La producción media de leche en la Estación Experimental del INIA es de 8 litros y de 6 litros en la Ganadera Cárdenas. Es importante mencionar la presencia de otros animales en ambos casos, como perros y ratones en la EE INIA; y perros y cerdos en la localidad de Mañazo.

No existen registros que permitan medir los índices productivos y reproductivos de estos animales. Asimismo, los programas sanitarios no son llevados a cabo con la frecuencia recomendada (vacunación y desparasitación) y la asistencia veterinaria es escasa.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materiales de apoyo

- Vacutainers.
- Agujas venoject de $21 \times 1\frac{1}{2}$
- Viales plásticos para conservar los sueros.
- Cajas térmicas.
- Hielo refrigerante.
- Centrífuga.
- Gradillas.

3.2.2. Materiales para la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT)

- Antígeno de *L. interrogans* serovares: *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *hardjo*.
- Suero de bovinos.
- Microscopio de campo oscuro.

- Micropipeta.
- Placas para diagnóstico.
- Pipetas Pasteur.
- Estufa.

3.3 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras fueron tomadas durante los meses de agosto y septiembre del 2005 (época de seca). La sangre fue obtenida de la vena de la cola, mediante el sistema de vacutainers asépticos de 5 ml., inmediatamente se procedió a la separación de los sueros mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. Las muestras de sueros fueron colocados en viales asépticos dentro de una caja térmica conteniendo hielo para su conservación durante su traslado al Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva de la Facultad de Medicina Veterinaria - UNMSM en Lima, donde fueron almacenados a -20 °C hasta su procesamiento.

3.4 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se utilizó para el diagnóstico, la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT), considerada prueba de referencia por la O.I.E. para la leptospirosis.

3.4.1 Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)

La prueba de aglutinación microscópica tiene como objetivo enfrentar diluciones seriadas de suero problema con igual volumen de una suspensión de antígeno a fin de detectar mediante observación microscópica en campo oscuro, la reacción antígeno-anticuerpo manifestada como aglutinación. Se usa antígenos vivos de *Leptospira* cultivados en laboratorio, la batería utilizada está representada por los serovares más prevalentes del área o en su defecto de por lo menos una cepa de referencia de los serovares más representativos de las especies más frecuentes según recomendación de a OMS.

3.4.2 Detección de anticuerpos contra *Leptospira sp*

Se utilizó una batería compuesta por cuatro serovares, correspondientes a cuatro serogrupos de *Leptospira sp*, cultivados, replicados y evaluados previamente a la realización de la prueba, estos fueron *Leptospira canicola*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. hardjo*.

Utilizando microplacas de 96 pocillos, se añadió 245 μ l de suero fisiológico en cada pocillo de la placa, luego en el primer pocillo se añadió 5 μ l del suero problema, homogenizándose varias veces, se tomaron 50 μ l pasándose al siguiente pocillo para obtener una dilución de 1/100.

Una vez terminado este procedimiento se llevaron las placas a un ambiente estéril para añadir 50 μ l del antígeno correspondiente, se homogenizó y fueron llevadas a la estufa a 28° C para ser incubadas por 2 horas. Se retiró de la estufa e hizo la lectura en el microscopio de campo oscuro con el objetivo 10X, colocando 10 μ l de cada dilución antígeno-suero en una lámina portaobjetos. Se midió el grado de aglutinación de cada antígeno en relación con el antígeno control utilizando la siguiente escala:

	% Aglutinación	% Leptospiras libres
+	25 %	75%
++	50%	50%
+++	75%	25%
++++	100%	0 – 25 %

Los sueros considerados positivos, fueron aquellos que a la observación en microscopio de campo oscuro presentaron aglutinación igual o mayor al 50% a por lo menos un serovar (dilución 1:100), se consideraron sospechosos a los que tuvieron aglutinación de 25%, a los cuales se hizo la repetición de la prueba, siendo considerados

sueros negativos todos aquellos que no presentaron aglutinación con ningún serovar, observándose igual al antígeno control.

3.4.3 Titulación de Anticuerpos

Los sueros encontrados positivos en el tamizaje fueron titulados a partir de la dilución 1:100. La microplaca fue rotulada con el código de los serovares en las columnas y las diluciones correspondientes en cada fila, empezando por la dilución 1:50, siguiendo con 1:100, 1:200 hasta la dilución 1:1600. Se colocó 50 μ l de suero fisiológico a cada pocillo a partir de la segunda fila y se agregó a la segunda fila 50 μ l de la dilución 1:50 utilizando la pipeta multicanal, siguiendo el mismo proceso se homogenizó el suero diluido de la segunda fila, traspasando 50 μ l a la tercera fila y así sucesivamente a lo largo de la columna, descartando los últimos 50 μ l para utilizar la última fila como control del antígeno. En cada fila agregar 50 μ l del antígeno correspondiente, posteriormente se homogenizó la microplaca e incubó a 28°C durante 2 horas. Se repitió el procedimiento para la lectura en el microscopio de campo oscuro, el título final fue dado por la mínima dilución de suero.

3.5 Análisis de datos

Se calculó la prevalencia de la prueba haciendo uso de la siguiente fórmula (Ahlbom y Norell, 1992), siendo expresado en porcentaje:

$$p (\%) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de sueros seropositivos}}{\text{N}^\circ \text{ de sueros muestreados}} \times 100$$

IV.- RESULTADOS

Se verificó que la edad no se comportaba como factor de confusión, mediante Mantel y Hanszel no siendo necesario realizar su control.

La prevalencia de *Leptospira sp* en los dos lugares de estudio: INIA y Mañazo fue de 2.59 % (3/116), mediante la prueba de MAT; observándose una prevalencia de 1.28% para la localidad de Ilpa y una prevalencia de 5.26 para la Ganadería Cárdenas en Mañazo (Cuadro 2).

Cuadro 2 Distribución de bovinos según procedencia y resultado a la prueba de MAT, Puno, 2005.

PROCEDENCIA	ANIMALES		PREVALENCIA
	ANALIZADOS	REACTORES	%
ILLPA	78	1	1.28
MAÑAZO	38	2	5.26
TOTAL	116	3	2.59

Los tres sueros reactores, mostraron positividad frente a la variedad *Leptospira icterohaemorrhagiae*, con un título 1:200 en los dos animales procedentes de la Ganadería Cárdenas en Mañazo y un título de 1:100 para el bovino procedente de ILLPA.

Al evaluar la variable edad, se determinó que uno de los reactores tenía 8 años, perteneciendo a la Estación ILLPA, representando una prevalencia de 3.70%, para el grupo etario; mientras que los otros dos animales positivos procedían de la localidad de Mañazo y ambos tenían tres años de edad, correspondiendo a una prevalencia específica para ese grupo etario de 15,38%, información presentada en los Cuadros N^{os} 3 y 4.

Cuadro 3 Distribución de bovinos según edad y resultado a la prueba de MAT, Illpa-Puno, 2005.

EDAD	ANIMALES		PREVALENCIA
	ANALIZADOS	REACTORES	%
Menos de 2	28	0	0.00
De 2 a 4	23	0	0.00
Más de 4	27	1	3.70
TOTAL	78	1	1.28

Merece la pena reiterar que el único serovar encontrado en el suero de los bovinos muestreados fue *icterohaemorrhagiae*, habiéndose trabajado con los cuatro serovares más representativos en nuestro medio (*canicola*, *pomona*, *harjo* e *icterohaemorrhagiae*).

Cuadro 4 Distribución de bovinos según edad y resultado a la prueba de MAT, Mañazo-Puno, 2005.

EDAD	ANIMALES		PREVALENCIA
	ANALIZADOS	REACTORES	%
Menos de 2	19	0	0.00
De 2 a 4	13	2	15.38
Más de 4	6	0	0.00
TOTAL	38	2	5.26

V. DISCUSION

Las prevalencias encontradas en bovinos pertenecientes a dos poblados de Puno en época de seca determinadas mediante la técnica de Microaglutinación (MAT) fueron de 1.28 % (1/78) en la Estación Experimental ILLPA- INIA y de 5.28% (2/38) en Mañazo - Ganadería Cárdenas, resultando en conjunto una prevalencia de 2.6% para estos dos. Los valores obtenidos son los esperados por ser época de seca (julio – agosto) en que se procedió al muestreo; ya que la temperatura en estos meses puede llegar a – 5°C (García *et al.*, 2002), haciendo menos probable la supervivencia del agente; aunque según algunos estudios estas bacterias pueden sobrevivir alrededor de 100 días con una temperatura de –20°C (Aguinaga *et al.*, 2000); manteniendo su vitalidad varios días a temperatura de refrigeración (5°C) (Erosa, 2001).

Herrera *et al.* (2000) realizaron un estudio en el departamento de Puno, encontrando una prevalencia de leptospirosis en el período de seca de 1.6% (1/64) en el INIA y de 1.1% (1/94) en La Raya; confirmándose que en este periodo se tienen prevalencia bajas, por otro lado, el nivel de anticuerpos séricos normalmente disminuye hasta niveles no detectables en los animales que están infectados persistentemente (Radostits *et al.*, 2002).

En los dos lugares evaluados (Mañazo e ILLPA), el sistema de crianza es de naturaleza extensiva, donde los animales se encuentran separados por grupos etarios, pero están expuestos a contacto con otros animales como roedores y perros en el caso de INIA; y perros y cerdos en Mañazo, pudiéndose encontrar roedores silvestres, los cuales son reservorios del serovar *icterohaemorrhagiae*, factor que podría explicar la predominancia de este serovar en los resultados de la prueba realizada, así se tiene que dentro de los animales seropositivos, el serovar *icterohaemorrhagiae* una prevalencia de 100%, esta misma situación se encontró en el estudio de Cachata (2006) en los mismos poblados pero realizada en época de lluvias, lo que nos hace pensar que el principal vector y diseminador de la enfermedad está representado por roedores principalmente.

Además, Rivera (2006), encontró que el serovar *icterohaemorrhagiae*, tenía predominancia al observar que dentro de los animales seropositivos un 57,14% en el período de lluvias y un 88,46% en época seca eran positivos a este serovar.

Se hallaron resultados que se pueden comparar con los encontrados por Herrera *et al.* (2000), también en el departamento de Puno, donde de los 53 animales se obtuvo una prevalencia de 3.8% en el año 2002.

Sepúlveda *et al.*, (2002), realizaron un estudio en México, en el que destacaron la importancia que tienen los roedores y canes domésticos en la diseminación de esta enfermedad en los establos y granjas de Jalisco. Se realizó la prueba con 13 serovares, aplicando la prueba de microaglutinación en placa (MAT). En ese estudio se muestrearon 354 ratas (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*) que fueron capturadas en las cercanías de estos establecimientos, y 419 caninos de la región, resultando que 22 (6.2%) de las ratas fueron positivas y 34 (9.6%) sospechosas, en cuando a los perros 95 (22.6%) de ellos fueron positivos y 24 (5.7%) sospechosos a *L. interrogans*. Esto indica que ambas especies son fuentes importantes de diseminación de la enfermedad dentro de los establecimientos ganaderos, sugiriendo que la presencia de hospedadores primarios en ambos predios tiene importancia; remarcando que los bovinos constituyen una especie de potencial importancia zoonótica, pues el serovar *icterohaemorrhagiae* es responsable de los cuadros de mayor gravedad en el hombre.

Por otro lado, cabe resaltar que no se encontró animales seropositivos a *Leptospira hardjo*, considerando que en el bovino es el reservorio de mantenimiento de esta especie animal. Al respecto, Radostits *et al.*, (2002) manifiestan que en los animales infectados persistentemente o crónicos, los niveles de anticuerpos pueden disminuir a valores no detectables y que el MAT no sería apropiado para diagnosticar enfermedades causadas por serovares adaptados al hospedador.

De la bioseguridad y de las medidas sanitarias que se realizan se sabe poco, los animales están libres, los registros son muy escasos; por lo tanto ante la presencia de abortos no se conoce con certeza el motivo de éste y posiblemente no se registre, pudiéndose encontrar *leptospiras* en las descargas vaginales, fetos de animales infectados o abortados; estas descargas vaginales post-abortos mantienen sus capacidades infectantes hasta por 8 días (Sandow y Ramírez, 2005). Por otro lado, las vacunaciones son deficientes ya que no se realizan o se realizan muy poco; además la interacción con otros animales hace más factible la transmisión del agente.

La edad y el sexo de los animales constituyen variables consideradas en el estudio, como posibles factores de riesgo; pero para ninguna de las dos variables se pudo establecer diferencias, debido a la distribución de animales según estas variables. En el caso del sexo de los animales, en la totalidad de bovinos muestreados sólo se tenía tres machos y ninguno de éstos fue positivo.

Por otro lado la edad tampoco fue un factor de importancia estadística, ya que de los 116 animales tan sólo tres bovinos tenían tres meses y el resto eran adultos.

Otros posibles factores que pueden favorecer la instalación de la infección en los animales son el momento del pastoreo en diferentes períodos de rotación; el agua proveniente de riachuelos donde acuden diversos animales, incluso otras especies de ganado, animales silvestres y roedores, en los cuales también miccionan y defecan; teniendo así posibles fuentes de infección para los bovinos.

En el presente estudio se encontró sólo tres animales seropositivos, de los cuales un bovino hembra fue positivo en la Estación Experimental ILLPA- INIA con ocho años de edad con un título de 1:100, y en el caso del poblado de Mañazo fueron dos bovinos hembras de tres años ambas, con un título de 1:300. Con respecto al sexo todos los positivos fueron hembras, pero cabe resaltar que en ambos poblados prevalecía el sexo hembra encontrándose sólo tres machos entre ambos poblados. En relación a la edad, todos los seropositivos fueron adultos, dos de tres años y uno de ocho años, explicándose esto por que estos animales han sido expuestos mucho más tiempo a la bacteria (Boqvist *et al.*, 2002); sin embargo otro factor que podría explicar la baja frecuencia de animales positivos es que podría tratarse de hospedadores crónicos y aparentemente la prueba de MAT no sería capaz de reconocer los anticuerpos en respuesta a esta bacteria.

En el caso del estudio de Cachata (2006) se obtuvo un título máximo de de 1:200, obtenido en una hembra de 5 meses de la localidad de Mañazo. Los títulos mínimos fueron de 1:100, obtenidos de dos hembras de 2 y 4 años procedentes de la localidad de ILLPA.

Por lo antes señalado, los resultados de este estudio indican una baja prevalencia de Leptospirosis en Puno en época de seca, lo cual no significa que no exista, ya que pueden existir hospedadores crónicos que el MAT no los pueda identificar o que podrían estar presentes serovares no considerados en el presente estudio.

Finalmente debemos considerar que la leptospirosis es una enfermedad de difícil erradicación, siendo necesario tener estrategias para disminuir el riesgo de diseminación, ya que roedores, perros y animales silvestres podrían ser vías de contagio, ya sea por contacto directo o indirecto. Un buen manejo sanitario tendría que abarcar vacunación, registros detallados, erradicación de roedores, medidas sanitarias a los animales de compañía y en la medida de lo posible no permitir el contacto con animales de otros hatos y silvestres para disminuir aún más la posibilidad de contagio (Sepúlveda *et al.*, 2002).

VI. CONCLUSIONES

- La infección con *Leptospira interrogans* se encuentra presente en el ganado bovino criado en dos poblados de Puno: Estación ILLPA y Ganadería Cárdenas; sin embargo, su prevalencia muy baja, habiéndose detectado sólo tres animales positivos de un total de 116 bovinos muestreados, representando una prevalencia de 2.59%.
- Se encontró sólo un seropositivo correspondiente al INIA representando una prevalencia específica para la Estación de 1.28%; mientras que de los animales de Mañazo dos fueron positivos, reflejando una prevalencia de 5.26%.
- Los tres animales seropositivos fueron adultos y hembras, pero no tiene mayor grado de significancia.
- El único serovar detectado en estos animales fue *Leptospira icterohaemorrhagiae*.
- Los títulos de anticuerpos hallados en los animales positivos fueron muy bajos, siendo el máximo título de 1:200 presente en dos bovinos de 3 años y de 1:100 en un bovino de 8 años.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con las investigaciones para determinar la presencia de otras serovariedades de *L. interrogans* en el ganado bovino de diferentes poblados de Puno, teniendo presente los diferentes serovares encontrados en trabajos anteriores desarrollados en esta región y en otras especies.
- Trabajar con adecuados registros para tener presente: problemas reproductivos que existan en la zona y determinar la causa y porcentaje de abortos que ocurran y problemas productivos relacionados a la enfermedad.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. **Acha, P.; B. Szyfres. 1989.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 2ª ed., p. 112-120. OPS, Washington, USA.
2. **Aguinaga, A.; A. Mesalina; P. Minaya; R. Del Aguila; E. Falconi; N. Reyes. 2000.** Leptospirosis. Oficina General de Epidemiología-INS. Disponible: <http://www.oge.sld.pe/documentostecnicos/leptospirosis.PDF> . (20/04/2006).
3. **Ahlbom, A.; S. Norell. 1992.** Fundamentos de epidemiología. 3ª ed. p 7. Ed. Siglo XXI, Madrid, España.
4. **Alonso, C.; F.J. García; L.M. Ortega. 2001.** Epidemiología, diagnóstico y control de la Leptospirosis bovina (Revisión). Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. (online), 16(2):205–225 Disponible: <http://www.inia.es/iaspa/2001/vol16-2/alons.PDF> (15/09/2005).
5. **Alfaro, C.; Y. Aranguren; A. Clavijo. 2004.** Epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis como fundamentos para el diseño de estrategias de control. Revista Digital CENIAP HOY. Disponible: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/alfaro_c/arti/alfaro_c.htm (20/04/2006).
6. **Alonso - Andicoberry, C.; F. García; J. Pereira; E. Costas; L. Ortega. 2001.** Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. Prev. Vet. Med. 52:109-117.
7. **Arbey, J.; J. Humberto; E. De Lima. 1998.** Leptospirosis icterohemorrágica. Presentación de un caso. Colombia Médica. 29: 43-46.
8. **Arce, J. Ribeyro, R.E. 1917.** Sobre un caso de espiroquetosis icterohemorrágica. Cron Med Lima. Perú. 34:355- 360.
9. **Arias, D.; N. Stanchi; P. Martino; M. Gatti; S. Arauz; A. Stornelly; E. Renner. 1999.** Comparación de cuatro antígenos para la determinación de anticuerpos antileptospiras en serología por ensayo inmunoenzimático (ELISA) en leptospirosis canina. Revista Biomed. 10:167-171.
10. **Aslantaş, Ö; V. Özdemir. 2005.** Determination of the seroprevalence of leptospirosis in cattle by MAT and ELISA in Hatay, Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 29: 1019-1024.
11. **Atxaerandio, R.; G. Aduriz; B. Moreno 2002.** Leptospirosis bovina. Rev. Bovis. 106: 47-61.

12. **Bharti, A.; J. Ricaldi; J. Nally; M. Matthias; M. Diaz; M. Lovett; P. Levett; R. Gilman; M. Willig; E. Gotuzzo; J. Vinetz. 2003.** Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infect. Dis.* 3: 751-757.
13. **Boqvist, S.; B. Chau; A. Gunnarsson; E. Olsson; I. Vågsholm; U. Magnusson. 2002.** Animal- and herd-level risk factors for leptospiral seropositivity among sows in the Mekong delta, Vietnam. *Prev. Vet. Med.* 53: 233-245.
14. **Branger, C.; B. Chatrenet; A. Gauvrit; F. Aviat; A. Aubert; J. Bach; G. Fontaine. 2005.** Protection against *Leptospira interrogans* sensu Lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated Protein1. *Infect. Immun.* 73: 4062-4069.
15. **Brown, C.A.; A.W. Roberts; M.A. Millar. 1996.** *Leptospira interrogans* serovar grippothyphosa infection in dogs. *J. Am Vet. Med. Assoc.* 209: 1265- 1267.
16. **Cachata, S. 2006.** Prevalencia de la leptospirosis bovina en dos distritos de la provincia de Puno-Puno. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria-UNMSM. Lima, 50 pp.
17. **Cermeño, J.; M. Sandoval; J. Bognanno; A. Caraballo. 2005.** Aspectos epidemiológicos y clínicos de la leptospirosis en el estado Bolívar, Venezuela, 1999-2000. Comparación de LEPTO-Dipstick y antígeno termorresistente de *Leptospira* (TR). *Invest. Clín.* 46: 317-328.
18. **Céspedes, M.; M. Glenny. 2002.** Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Serie de Normas Técnicas N° 34. Ministerio de Salud del Perú. Instituto Nacional de Salud. Perú. 53p.
19. **Córdova, A. 2006.** Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. VII: 1. *Factores relacionados con el aborto en yeguas.*
20. **Costa, M.; A. Ravara; M. Cota. 2006.** Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol. Methods.* 65: 247-257.
21. **Ciceroni, L.; S. Ciarrocchi; A. Ciervo; A. Petrucca; A. Pinto; A. Calderaro. 2002.** Differentiation of leptospire of the serogroup Pomona by monoclonal antibodies, pulsed-field gel electrophoresis and arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Res. Microbiol* 153: 37-44.
22. **De la Peña, A.; D. Bulach; B. Adler. 2001.** Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 31: 73-81.

23. **Diament, D.; M. Colo; E. Calo; E. Georges; R. Salomao. 2002.** Peripheral Blood Mononuclear Cell Activation Induced by *Leptospira interrogans* Glycolipoprotein. Infect. Immun. 70: 1677–1683.
24. **Ellis, W.A.; J.J. O' Brien. 1982.** Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. Vet. Rec. 110: 147- 150.
25. **Ellis, W.A. 1986.** Effects of Leptospirosis on bovine reproduction. In: Morrow D A (ed) Current Therapy in Theriogenology 2nd ed Philadelphia WB Saunders pp 267-271.
26. **Ellis, W.A. 1994.** Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North. Am., Food Anim Pract. 10(3): 463-478.
27. **Erosa, A. 2001.** Estructura genética y fisiología del género *Leptospira*. Rev Biomed. 12: 282-287.
28. **Faber, N.; M. Crawford; R. LeFebvre; N. Buyukmihci; J. Madigan; N. Willits. 2000.** Detection of *Leptospira* spp. in the Aqueous Humor of Horses with Naturally Acquired Recurrent Uveitis. J Clin Microbiol. 38: 2731–2733.
29. **Faine, S. 1994.** Leptospira and Leptospirosis; SRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
30. **Faine, S. 1991.** The genus Leptospira. In: Barlows A., Truper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H. (Eds.) The prokaryotes. Springer- Verlag. 2nd edition. pp 3568-3582.
31. **Fernández, J.J. 1993.** Detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en bovinos de hatos lecheros en el valle de Atlixco, Puebla, mediante la prueba de aglutinación microscópica. Veterinaria México. México. 24 (1), pp 47-49.
32. **Fowler, M. 2003.** Leptospirosis. En Zoo & Wild Animal Medicine: Current Therapy 5. Saunders Publeshers. EEUU. 982 p.
33. **García, W.; F. San Martín; C. Novoa; E. Franco. 2002.** Engorde de llamas bajo diferentes regímenes alimenticios. Rev. Investig. Vet. Perú. 13: 1-9.
34. **Guitian, F.; G. Garcia; J. Oliveira; M. Sanjuan; E. Yus. 2001.** Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. Vet. Microbiol. 80: 275-284.
35. **Greene, C.E. 2000.** Enefermedades infecciosas de perros y gatos. 2da Edición. Mc Graw- Hill Interamericana. México. pp 302- 311.

36. **Guijarro, R.; E. Calvo. 1999.** Tratamiento y control de la leptospirosis bovina. Mundo Ganadero. Disponible:
<http://www.eumedia.es/articulos/mg/113antibioticos.html> (20/04/2006).
37. **Haake, D.; M. Mazel; A. McCoy; F. Milward; G. Chao; J. Matsunaga; E. Wagar. 1999.** Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 Exhibit Synergistic Immunoprotection. *Infect. Immun.* 67: 6572–6582.
38. **Harkin, K.R., Gartrell CL 1996:** Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990- 1995), *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 32: (495- 501)
39. **Herrer, A; G. Battistini; J. Liceras, J. 1957.** Presencia de la *Leptospira bataviae* en el Perú. *Rev Med Exp. Perú.* 11: 29- 33.
40. **Herrera, J.; S. Vasconcellos; Z. Morais; F. Ferreira; S. Sakamoto; J. Ferreira; S. Pinheiro. 2000.** Seropositividad para leptospirosis en alpacas criadas en el altiplano peruano. Puno, Perú. Análisis de asociación con el índice pluviométrico. *Arq. Inst. Biol, Sao Paulo. Brasil.* (online), 67(2): 171-176. Disponible:
http://www.biologico.sp.gov.br/arquivos/V67_2/5.pdf (15/08/2005)
41. **Higgins, R.; J. Descôteaux; R. Degré. 1980.** Pathogenesis of experimental *Leptospira interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae* infection in the guinea pigs: possible role of endotoxin of intestinal bacteria in the development of lesions. *Can. J. Comp. Med.* 44: 304–308.
42. **Jubb, K.; P. Kennedy. 1974.** Patología de los animales domésticos. Tomo III. Ed. Hemisferio Sur. Cuba. 3ª ed. p. 159-165.
43. **Kadis, S.; W.L. Pugh. 1974.** Urea utilization by leptospira. *Infect. Immun.* 10(4): 793-801.
44. **Laguna, V. 2000.** Leptospirosis, módulo técnico. Serie de documentos monográficos N2 OGE- INS. Perú. 56pp
45. **Lee, S.; S. Kim; S. Park; M. Kim. 2002.** Cytotoxic Activities of *Leptospira interrogans* Hemolysin SphH as a Pore-Forming Protein on Mammalian Cells. *Infect. Immun.* 70: 315–322.
46. **Leonard, F.; P.J. Quinn; W.A. Ellis. 1992.** Possible effect of pH on the survival of leptospires in cattle urine. *Vet. Rec.* 131(3):53-54.
47. **Leonard, F.C.; P.J. Quinn; W.A. Ellis. 1993.** Association between cessation of leptospiruria in cattle and urinary antibody levels. *Res. Vet. Sci.* 55(2): 195-202.
48. **Levett, P. 2001.** Leptospirosis, *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 296–326.

49. **Liceras de Hidalgo, J; E. Higuchi. 1984.** Casos de Leptospirosis confirmados en el Instituto Nacional de Salud (1982- 1983). Bol INS. Perú. 5(3): 92- 93.
50. **Lin, M.; O. Surujballi; K. Nielsen; S. Nadin; G. Randall. 1997.** Identification of a 35- kilodalton serovar-cross-reactive flagellar protein, FlaB, from *Leptospira interrogans* by N-terminal sequencing, Gene cloning, and sequence analysis. Infect. Immun. 65: 4355-4359
51. **Lomar, A.; D. Diament; J. Torres. 2000.** Leptospirosis in Latin America. In: Infectious disease clinics of North America. 14 (1): 23- 29.
52. **Lottersberger, J.; R. Pauli; N. Vanasco. 2002.** Desarrollo y validación de un enzimoimmunoensayo para el diagnóstico de leptospirosis bovina. Arch. Med. Vet. 34: 89-95
53. **Lucchesi, P.; A. Parma. 1999.** A DNA fragment of *Leptospira interrogans* encodes a protein which shares epitopes with equine cornea. Vet. Immunol. Immunophatol. 71: 173-179
54. **Lugo, S.; R. López; I. Briceño; R. Bolívar; F. Anduela. 2001.** Encuesta seroepidemiológica de la leptospirosis bovina en la región sur del lago de Maracaibo. Venezuela. Años 1998-1999. Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes, Venezuela. (online), 42 (4): 17-19. Disponible: <http://www.saber.ula.ve/db/ssaber/Edocs/pubelectronicas/revistafarmacia/vol42/articulo42-4.pdf> (15/08/2005).
55. **Luna, M; L. Moles; J. Torres; F. Gual. 1996.** Investigación serológica en fauna silvestre mantenida en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la ciudad de México. Vet. Méx. 27 (3): 229- 234.
56. **Luna, M.; L. Moles; D. Gavaldón; C. Nava; F. Salazar. 2005.** Estudio retrospectivo de seroprevalencia de leptospirosis bovina en México considerando las regiones ecológicas. Rev Cubana Med Trop. ene.-abr. (online),57(1):28-31.Disponible: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602005000100005&lng=es&nrm=iso. ISSN 0375-0760.(02/11/2005).
57. **Llorente, P.; L. Leoni; M. Martinez. 2002.** Leptospirosis en camélidos sudamericanos. Estudio de prevalencia serológica en distintas regiones de la Argentina. Arch. Med. Vet. 34: 59-68.
58. **Marangoni, A.; R. Aldini; V. Sambri; L. Giacani; K. Di Leo; R. Cevenini. 2004.** Production of tumor necrosis factor α by *Treponema pallidum*, *Borrelia*

- burgdorferi* s.l., and *Leptospira interrogans* in isolated rat Kupffer cells. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 40: 187-191.
59. **Mazonelli, D; E. Argento; J. Barriola; R. Caminoa; M. Draghi; M. Saravi. 1994.** Comisión Científica permanente sobre Leptospirosis- SENASA. Diagnóstico-Perú. 11- 28.
 60. **Mauilloux, M. 1975.** Leptospirosis = zoonosis. Int. J. Zoon. 2: 45-54
 61. **Midwinter, A; T. Vinh; S. Faine, 1994.** Characterization of an antigenic oligosaccharide from *Leptospira interrogans* serovar Pomona and its role in immunity. Infect Immun. 62: 5477- 5482.
 62. **Miranda, F. 1998.** Selección de gramíneas forrajeras precoces y resistentes a heladas. Instituto Nacional de Investigación Agraria – INIA. (Online). Disponible: <http://www.visionveterinaria.com/articulos/17.htm> (20/11/2005).
 63. **Ochoa, J. E.; A. Sánchez; I. Ruiz. 2000.** Epidemiología de la Leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. Rev. Panam. Salud Pública/ Pan Am J Public Health. 7(5).
 64. **OIE. 2004.** Manual para el diagnóstico de la leptospirosis. Disponible en: http://int/eng/normes/mmanual/A_00041.html . (20/11/2005).
 65. **Perret, C.; K. Abarca; J. Dabanch; V. Solari; P. García; S. Carrasco; R. Olivares; P. Avalos. 2005.** Prevalencia y presencia de factores de riesgo de leptospirosis en una población de riesgo de la Región Metropolitana. Rev Méd Chile. 133: 426-431.
 66. **Plank, R.; D. Dean. 2000.** Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. Microbes and Infection. 2: 1265-1276
 67. **Radostits, O.; C. Gay; D. Blood; K. Hinchcliff. 2002.** Medicina Veterinaria, tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol. I, IX Ed. en español. p 1150-1168 Edit. McGraw-Hill Interamericana. España.
 68. **Ramadass, P.; B. Samuel; K. Nachimuthu. 1999.** A rapid latex agglutination test for detection of leptospiral antibodies. Vet. Microbiol. 70: 137-140.
 69. **Rebhun, W. 1999.** Enfermedades del ganado vacuno lechero. Edit. Acribia S. A. Zaragoza-España. 611-613p.
 70. **Richtzenhain, L.; A. Cortez; M. Heinemann; R. Martins; S. Miyoshi; S. Arruda; Z. Morais; E. Scarcelli; M. Élide. 2002.** A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. Vet. Microbiol. 87: 139-147.

71. **Riedemann, S.; H. Leal; J. Zamora. 1986.** Diagnóstico serológico de Leptospirosis Bovina en cuatro regiones de Chile. Arch. Med. Vet.
72. **Rivera, A.; A. De la Peña; M. Roa; M. Ordoñez. 1999.** Seroprevalencia de leptospirosis en perros callejeros del norte de la ciudad de México. Vet. Mex., 30(1): 105-107.
73. **Rivera, Z. 2006.** Prevalencia de leptospirosis en alpacas de la Estación Experimental de Maranganí-IVITA, Cusco y su asociación con la época del año y sexo. Tesis de Médico Veterinario, Facultad de Medicina Veterinaria-UNMSM, Lima. (en prensa).
74. **Sadow, K; W. Ramírez. 2005.** Leptospirosis. Centro de estudios prevención y mitigación de desastres. Fac. Med. Vet. Univers. de Granma. Cuba. Disponible: <http://www.monografias.com/trabajos17/leptospirosis/leptospirosis.shtml> (1/11/2005).
75. **Saraví, M.A.; G. de Mazzonelli; J.M. Mazzonelli. 1991.** Análisis y Evaluación de la Metodología de Diagnóstico, Prevención y Control de la Leptospirosis. Informe producido por la Comisión Científica sobre la Leptospirosis. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, Buenos Aires, Argentina.
76. **Sepúlveda, A.; J. Santiago; F. Preciado. 2002.** La rata y el perro, importantes vectores de la leptospirosis en explotaciones pecuarias de Cd. Guzmán, Jalisco. Rev. Cubana Med. Trop. (online), 54(1): 21-23. Disponible: <http://www.ipk.sld.cu/lepto2004/lepto1/4mtr0502.pdf> . (01/09/2005).
77. **Skilbeck, N.W.; W.M. Forsyth, W.M.; M. Dohnt. 1988.** Bovine leptospirosis: microbiological and histological findings in cattle at slaughter. Aus. Vet. J. 65, 73-75.
78. **Smits, H.; M. Der Hoorn; M. Goris; G. Gussenhoven; C. Yersin; D. Sasaki. 2000.** Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis, J. Clin. Microbiol. 38: 1272–1275. Smythe, L.; I. Smith; G. Smith; M. Dohnt; M. Symonds; L. Barnett; D. McKay. 2002. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira spp.* Infect. Dis. 2: 13.
79. **Smythe, L.; I. Smith; G. Smith; M. Dohnt; M. Symonds; L. Barnett; D. McKay. 2002.** A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira spp.* Infect. Dis. 2: 13.
80. **Thiermann, A.B. 1982.** Experimental leptospiral infection in pregnant cattle with organisms o the Hebdomadis serogroup Am. J. Vet. Res. 43(5): 780-784.
81. **Thiermann, A.B. 1983.** Bovien leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. Am. J. Vet. Res. 44(12): 2244-2245.

- 82. Thompson, J.C.; B.W. Manktelow. 1989.** Pathogenesis of renal lesions in haemoglobinaemic and non-haemoglobinaemic leptospirosis. J. Comp. Path. 101(2): 201-214.
- 83. Vasallo, R.; Shoemaker, E; Zamalloa, O. 1968.** Tres casos de leptospirosis en niños. Trib Med. 5 (204):1.
- 84. Verma, A.; S. Artiushin; J. Matsunaga; D. Haake; J. Timoney. 2005.** LruA and LruB, Novel Lipoproteins of Pathogenic *Leptospira interrogans* Associated with Equine Recurrent Uveitis. Infect. Immun. 73: 7259–7266.
- 85. Vinetz J.M. 2001.** Leptospirosis. Curr. Opinión Infect Dis. 14(5):527-538.
- 86. Yitzhaki S., A. Barnea; A. Keysary; E. Zahavy. 2004.** New Approach for Serological Testing for Leptospirosis by Using Detection of *Leptospira* Agglutination by Flow Cytometry Light Scatter Analysis. J Clin Microbiol; 42(4):1680-1685.
- 87. Zamora, J.; S. Riedemann. 1999.** Animales silvestres como reservorio de leptospirosis en Chile: una revisión de los estudios efectuados en el país. Arch. Med. Vet. 31: 151- 156